

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-127870

(43)Date of publication of application : 18.05.1999

---

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12N 5/10

---

(21)Application number : 10-194872 (71)Applicant : MAYO FOUND FOR  
MEDICAL  
EDUCATION & RES

(22)Date of filing : 09.07.1998 (72)Inventor : LEVINE JAMES A  
EBERHARDT  
NORMAN L  
JENSEN MICHAEL D  
O'BRIEN TIMOTHY

---

(30)Priority

Priority	97 890467	Priority	09.07.1997	Priority	US
number :		date :		country :	

---

(54) TRANSFER OF GENE INTO ADIPOCYTE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a model system useful for research of genetic regulation of growth and metabolism of mast cells and also, useful for research of biological effects of protein products expressed by target genes or nucleic acid sequences.

SOLUTION: This model represents such an in vivo method for transferring the nucleic acid sequence into adipocytes as to comprise contacting mammalian adipose tissues with a transfer vehicle containing a nucleic acid sequence, wherein the transfer vehicle has activity to intrude into adipocytes, and when the nucleic acid sequence is transferred into adipocyte, a product expressed by the nucleic acid sequence is produced.

---

**BEST AVAILABLE COPY**

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's  
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application  
other than the examiner's decision of  
rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] Said approach which will be characterized by producing a manifestation product from this nucleic-acid array if it is the in vivo approach which introduces this nucleic-acid array into the fat cell which comes to contain contacting the fat tissue of mammalian to the introductory vehicle containing a nucleic-acid array, it has the capacity for this introductory vehicle to invade at this fat cell and this nucleic-acid array is introduced into this fat cell.

[Claim 2] Furthermore, an approach including detecting existence of this manifestation product according to claim 1.

[Claim 3] Furthermore, an approach including making existence of this manifestation product correlate with the physiological effectiveness in this fat cell according to claim 2.

[Claim 4] The approach according to claim 1 this introductory vehicle contains adenovirus.

[Claim 5] The approach according to claim 1 this introductory vehicle contains liposome.

[Claim 6] The approach according to claim 1 this nucleic-acid array carries out the code of a macrophage colony-stimulating factor or its part.

[Claim 7] The approach according to claim 1 by which this nucleic-acid array is adjusted in discernment in a fat cell.

[Claim 8] The approach according to claim 7 by which this nucleic-acid array is adjusted in discernment in a white fat cell pair brown fat cell.

[Claim 9] The approach according to claim 8 this nucleic-acid array carries out the code of uncoupling protein I or its part.

[Claim 10] The transfected fat cell which comes to contain the introductory vehicle containing the nucleic-acid array adjusted in discernment in a fat cell.

[Claim 11] Said fat tissue characterized by including the introductory vehicle which is fat tissue and contains the nucleic-acid array in which at least one

fat cell in this fat tissue is adjusted in discernment in a fat cell.

[Claim 12] Said approach characterized by being the approach of changing the growth and the metabolic regulation of a fat cell in this mammalian that comes to contain contacting the fat tissue of mammalian to the effective dose of the introductory vehicle containing a nucleic-acid array, having the capacity for this introductory vehicle to invade into the fat cell of this mammalian, and the manifestation product from this nucleic-acid array in this fat cell changing growth and the metabolic regulation of this fat cell.

[Claim 13] The approach according to claim 12 by which this nucleic-acid array is adjusted in discernment in a fat cell.

[Claim 14] The approach according to claim 12 by which this nucleic-acid array is adjusted in discernment in a white fat cell pair brown fat cell.

[Claim 15] The approach according to claim 14 this nucleic-acid array is uncoupling protein I.

[Claim 16] Said approach of being the identification approach of a manifestation product of changing growth in a fat cell, and a metabolic regulation, introducing a candidate nucleic-acid array all over the fat tissue of mammalian, and making produce this manifestation product from this candidate nucleic-acid array within this fat cell, and coming to contain supervising growth in b this fat cell, and change of a metabolic regulation.

[Claim 17] The approach according to claim 16 the monitor of change of the metabolic turnover of a fat cell includes investigating change of the amount of fat tissue.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]**

**[0001]**

**[Field of the Invention]** This invention relates to such a gene expression product that is participating in screening of the approach of introducing a genetic material into a fat cell, and a gene, growth of a fat cell, and metabolic accommodation potentially.

**[0002]**

**[Description of the Prior Art]** Obesity can be defined as the condition that superfluous fat tissue exists. People of the remarkable rate of the population of 30 – 50% of the population of North America and the whole world are growing fat. It is presumed in 1990 for the effect of obesity, for example, non-insulin dependent diabetes mellitus, a coronary-arteries disease, and hypertension that it cost the direct expense of 45,800 million dols and indirect costs of 23 billion more dols from employment impossible (missed work) (Gibbs, W.W., August, 1996, Scientific American, p.88-94). Furthermore, estimated 30 billion dols is poured into the loss-in-quantity product every year (Gura, T., 1997, Science, 275:751-753).

**[0003]** Since change arises in generating of obesity within an ensemble and an individual with the passage of time, it is suggested that the environmental factor has played a certain role in progress of obesity. It is known that a hereditary factor will also have big effect on obesity. The body mass characteristic which is one of the scales of obesity will usually become the same among a family's constituents. For example, an adopted child's body mass characteristic becomes a thing similar to the real parent instead of the Yabu mother. It is shown that other scales (for example, hypodermically sebum (subcutaneous skinfold) thickness, the amount of adipose substances, and fat-less mass) about obesity will become the same from the detailed research by monozygotic twins (Sorensen, T.I.A.1995, Metabolism, 44:4-6, and Suppl.3).

[0004] Superfluous fat tissue accumulates by the imbalance of energy intake and energy expenditure. Under the therapy of obesity, in order to correct this imbalance, caloric intake is usually operated. Although there are various obesity therapy programs which decrease intake of a calorie through a patient's education, about 90% has gone wrong after five years or ten years of trace. The preparation object for nutrition maintenance for filling up or permuting the usual food is contained in other programs. If it stops a patient taking in such a supplement agent typically, weight will increase again (Pi-Sunyer, F.X., 1996, Clinical Therapeutics, 18(6):1006-1035).

[0005] Most current pharmacology-therapies over obesity tend to obtain a significant loss weight by making cerebral hypothalamus into a target. However, interruption of a therapy increases again the weight in which patients decreased in number in many cases (Davis, R., 1996, Drugs, 52(5): 696-724; Ryan, D.H., 1996, Endocrinology & Metabolism Clinics of North America, 25(4):989-1004). Much cost starts such a therapy and it takes the formula covering the supervisor and the whole life by the medical practitioner. Moreover, a side effect critical [ these therapies ] and inconvenient may be caused. Use of the anorectic, especially a FEN full lamin derivative relates to the increment in the risk of primary pulmonary hypertension in the patient who is taking in this medicine three months or more (Abenhaim, L and others [ 1996 ], N.Engl.J.Med., 335:609-616). It is indicated that there are other side effects, such as change of the abnormalities in a heart rhythm and sensorium, in such a therapy (Davis, R., 1996, Drugs 52(5):696-724). Moreover, a disappointment since effect was not proved preferably [ a side effect profile ] in research by Homo sapiens over a long period of time although B3 adrenoreceptor agonist was evaluated as a potential remedy to obesity.

[0006] Another possible cure for obesity is an operation. While a gastric-bypass operation maintains normal digestion and absorption, it means restricting a patient's caloric intake by decreasing stomach size. This therapy is restricted to the patient of a morbid obesity for the complication after the high death rate (5%) by operation, and an operation.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although hardly observed until now about the elucidation of the genetic regulation in the fat cell which is the terminal organ official of obesity, or fat tissue, such accommodation may have played a certain role in generating or prevention of obesity. Most cures which, as for the therapy-break in in obesity, make a fat cell or fat tissue a target since it has been focused on the central nervous system are not developed. Probably, it will be useful to identify the gene which participates in growth of a fat cell, and metabolic accommodation and obesity, and to develop a useful model system to the elucidation of the role of such a gene in accommodation of a fat cell, since a fat cell and fat tissue are storage of a lipid, and the place

of the complicated fat metabolism. Such a model system may offer the foundation of the cure which made fat tissue the target in the therapy and prevention of obesity.

[0008]

[Means for Solving the Problem] This invention provides with a useful model system research of the biological effectiveness of the protein manifestation product of the gene or nucleic-acid array which it is useful to growth of a fat cell, and research of metabolic genetic regulation, and is made into the purpose at them. this invention offers the approach of introducing this nucleic-acid array into this fat cell so that the manifestation product of a nucleic-acid array may be made to produce in a fat cell as indicated in this detail letter. Moreover, it can be made to correlate with physiological effectiveness, such as an increment in storage of this manifestation product of a fat, or reduction. This invention offers the approach of changing the growth and/or the metabolic turnover of a fat cell in mammalian again, and this approach can be used in therapy, in order to treat obesity or to promote fat storage according to the need for each patient.

[0009] This invention makes the theme the in vivo approach which introduces a nucleic-acid array into a fat cell in one mode. This approach comes to contain contacting the fat tissue of mammalian to the introductory vehicle containing this nucleic-acid array. This introductory vehicle (for example, adenovirus or liposome) has the capacity which invades into a fat cell, and contains a nucleic-acid array. If this nucleic-acid array is introduced into this fat cell, a manifestation product will be produced from this nucleic-acid array. This approach can include detecting existence of this manifestation product and making existence of this manifestation product correlate with the physiological effectiveness in this fat cell further. An example of the nucleic-acid array shown in this specification when it is introduced by in vivo into a fat cell and physiological effectiveness is given is a nucleic-acid array which carries out the code of the macrophage colony-stimulating factor (MCSF).

[0010] The nucleic-acid array introduced into a fat cell in this invention may be an array (for example, array with well-known being adjusted in discernment in a white fat cell pair brown fat cell) with well-known being adjusted by the discernment target (differentially) in a fat cell. Uncoupling protein I (UCPI) or its part is an example of a nucleic-acid array with well-known being adjusted in discernment in a white fat cell pair brown fat cell.

[0011] This invention makes the theme the fat cell containing the introductory vehicle containing the nucleic-acid array adjusted in discernment in a fat cell in another mode. Furthermore, this invention is the fat tissue isolated from mammalian, and makes the theme fat tissue characterized by containing at least one fat cell to which this fat tissue holds

the introductory vehicle containing the nucleic-acid array adjusted in discernment in a fat cell.

[0012] This invention makes the theme further the approach of changing the growth and the metabolic regulation of a fat cell in mammalian, in another mode. This introductory vehicle has the capacity which invades into the fat cell of this mammalian coming [ the process at which this approach contacts the fat tissue of mammalian to the effective dose of the introductory vehicle containing a nucleic-acid array ]. Production of the manifestation product from this nucleic-acid array in a fat cell changes growth and the metabolic regulation of this fat cell. The gene adjusted in discernment in a white fat cell pair brown fat cell or its part is contained in a suitable nucleic-acid array. UCPI or its part is mentioned as an example of such a nucleic-acid array. In a patient, obesity is treated or this approach offers the foundation of the therapy-break in for promoting growth or growth of fat tissue.

[0013] This invention relates to the identification approach of a nucleic-acid manifestation product of changing growth in a fat cell, and a metabolic regulation, in another mode. A candidate nucleic-acid array is introduced all over the fat tissue of mammalian. A product is made to discover from this nucleic-acid array, and growth of a fat cell and change of a metabolic regulation are supervised. It is one of the desirable approaches of supervising growth and the metabolic regulation of a fat cell to investigate change of the weight of fat tissue.

[0014] This invention has some advantages as indicated in this specification. The model system which this invention offers makes it possible to screen the nucleic-acid array which can participate in the metabolic turnover of a fat cell, and accommodation of growth by in vivo all over the fat cell which is the terminal organ official of obesity, and fat tissue. in Evaluation of a candidate nucleic-acid array is enabled in the physiological situation that it has not been independent physiologically [ vivo screening / others / in / in the effectiveness of a manifestation product / mammalian ] like a biochemical process to an in vitro culture system. By identifying the nucleic-acid array which participates in growth and the metabolic regulation of a fat cell, to obesity, or, the new target of a cure to the patient to whom fat tissue or reserve oil is missing is offered.

[0015]

[Embodiment of the Invention] This invention relates to the approach of investigating the biological effectiveness of the nucleic-acid manifestation product in a fat cell and fat tissue by in vivo. By this approach, a genetic material is introduced into the fat cell in the fat tissue of mammalian by making the introductory vehicle containing a genetic material contact. After invading into a fat cell, a product is discovered from this genetic material.

[0016] The fat cell which is a cell which stores a lipid is a potential target of



an obesity cure which is not yet developed. Since it is defined as obesity being in the condition that superfluous fat tissue exists, this organization is equivalent to the end organ of this disease. A fat cell occupies 90% or more of fat tissue. The substrate organization which are other major components contains the fibroid band which makes a \*\* office field constitute a fat cell, a blood vessel, a nerve, and a lymphatic duct. Although the hereditary factor is participating in easy in that of obesity, this has suggested that the biological event in fat cells, such as up-regulation of a gene or a superfluous manifestation, has affected in medium the susceptibility which stores a calorie superfluous as a fat into a fat cell, or is reflecting such susceptibility at least.

[0017] The local difference of fat tissue deposition arises in all mammals. In Homo sapiens, local fat tissue deposition serves as an omen of the metabolic disease condition (metabolic morbidity) relevant to obesity. In accordance with these observation, if at least a fat stores dept. changes remarkably with "depots (depots)", the research report of metabolic activity and the gene expression is carried out. There is some of a series of proof which suggests that fat tissue can accumulate locally.

[0018] By Homo sapiens, the size of the storage tank with which fat tissue already exists increases [ 1st ] as weight increases. If fat tissue is surgically removed [ 2nd ] from a partial part, local re-are recording of fat tissue will arise to the part. The inflammation of intestines and the skin relates [ 3rd ] to growth of the local fat tissue around an inflammation field. The causative agent which promotes local fat tissue deposition is not yet identified.

[0019] A fat cell is seen also in hypodermically and bone marrow. It is known that a bone marrow fat cell will compound the cytokine of a large number containing a tumor necrosis factor alpha (TNFalpha), a granulocyte colony-stimulating factor (GCSF), a macrophage colony-stimulating factor (MCSF), and various interleukin. Cytokine is indispensable to hemopoiesis and terminal differentiation of a multipotential stem cell (Yoshikubo, T.1994, Blood, 84:415-420). Histologically, bone marrow and a hypodermic fat tissue fat cell are similar, and a lipid occupies 95% of cell capacity.

[0020] Although it was thought for many years that a subcutaneous adipose tissue was a reserve tissue, it secreting hormone and cytokine and answering such a signal is known for current. On the other hand, the reduction in weight is accompanied by reduction of a manifestation of TNF-alpha with the increment in the TNF-alpha manifestation in a skinfold thickness cell by the increment in weight, and the increment in fat tissue mass (Hotamisligil, G.S. and others, 1993, Science, 259:87-91). A skinfold thickness cell secretes the leptin which is hormone which participates in the weight control path of a rodent animal again (Saladin, R. and others, 1996, Hormone & Metabolic Research, 28 (12):638-641).

[0021] The fat cell of two different molds, a white fat cell and a brown fat cell, constitutes white adipose tissue and brown adipose tissue, and exists in mammalian, respectively. A white fat cell stores a fat as a single adhesive big lipid droplet (lipid droplet), and emits it behind according to auxotrophy. A brown fat cell stores a lipid into a minute drop, and serves as a source of production of heat in a certain kind of mammalian, and a human newborn infant. Uncoupling protein I (UCPI) is protein of 33kDa(s) peculiar to the mitochondrial membrane of a brown fat cell, carries out uncoupling of the breathing from oxidative phosphorylation, and produces heat. The manifestation of UCPI answers chill and superfluous caloric intake, and is adjusted by the sympathetic nervous system (Sears, I.B., 1996, Mol.Cell.Biol., 16(3):3410-3419).

[0022] In the one embodiment of this invention, the in vivo approach which introduces a nucleic-acid array into the fat cell located in hypodermically mammalian fat tissue is offered. This approach comes to contain contacting the fat tissue of mammalian to the introductory vehicle which may invade into a fat cell. After this introductory vehicle contains a nucleic-acid array and it is introduced into a fat cell, a manifestation product is produced from this nucleic-acid array. This approach offers a model system very effective in the identification and evaluation of a nucleic-acid array which discover the product which changes growth of a fat cell, and metabolic accommodation.

[0023] "The introductory vehicle" used by this invention means the matter of the arbitration which has the capacity which invades into a fat cell by contact and arranges a nucleic-acid array to this intracellular one. Although recombination adenovirus and liposome are contained in the example of such matter, it is not limited to these. Recombination adenovirus does not have rash that can operate it easily in a laboratory, and the growth for transgenics is unnecessary and is incorporated into a host genome (Smith, T.A. and others, 1993, Nat.Genet., 5:397-402, Spector, D.J. and Samanigo, L.A., 1995, Meth.Mol.Genet., 7:31-44). Adenovirus Various cell types, for example, a keratin cell, hepatocyte, and an epithelial cell, In order to introduce by in vitro to a terminal differentiation fat cell recently very much It is used (Gnudi, L., 1997, Mol.Endo., 11(1):67-76, Frevert, E.U. and Kahn, B.B., 1997, Mol.Cell.Biol., 17(1):190-198).

[0024] Liposome is an artificial membrane vesicle useful as conveyance support in in vitro and in vivo. Liposome is used for carrying a nucleic-acid array into [ other than a mammalian cell ] vegetation, yeast, and a bacterial cell. The presentation of liposome is the combination of phospholipid (phospholipid of especially high phase transition temperature), and is usually combined with a steroid (especially cholesterol). It is also possible to use other phospholipid or other lipids. The physical characteristic of liposome is influenced by existence of pH, ionic strength, and a bivalence cation.

[0025] The "nucleic-acid array" used by this invention means the nucleotide sequence which carries out the code of a certain perfect protein or its part. The nucleic-acid array of this invention may be the gestalt of DNA containing the gestalt or cDNA, synthetic DNA, or genomic DNA of RNA. DNA may be a double strand or a single strand. The nucleic-acid array suitable for this approach can include the array of the target arbitration, and can include the array from the gene with which what is adjusted in discernment in the fat cell (the thing from various fat cell molds, such as a white fat cell which exists in the brown fat cell which exists in brown fat, and a white fat, is included) of an individual (differentially regulated) is known. It is turned to the nucleic-acid array which gives the profile of the manifestation product which is given [ "it is adjusted in discernment", and ] to control of an intracellular imprint, processing, transportation, mRNA stability, or a translation, and changes with cells used by this invention. As a nucleic-acid array in which being adjusted in discernment in a fat cell is known, the nucleic-acid array which carries out the code of lipoprotein lipase, leptin, and the UCPI is mentioned, for example.

[0026] The example of the approach of contacting the fat tissue of mammalian to such an introductory vehicle in this invention is indicated in the after-mentioned example. Generally, the fat tissue of mammalian is locally contacted by the introductory vehicle and injection. Probably, it will also be possible to use the skin contact by a patch or the lotion as an exception method of contact. After contacting fat tissue to an introductory vehicle, a manifestation product is made to produce from this nucleic-acid array. A Northern blot can be used in order to detect the messenger RNA which carries out the code of the manifestation product. Moreover, for example, existence of a manifestation product is detectable with western blotting and immunoblotting. The manifestation of local contact of an introductory vehicle and the nucleic-acid manifestation product following it enables it to simulate a very specific living thing response. Furthermore, partial administration can suppress an inconvenient side effect to the minimum. Existence of a manifestation product can be made to correlate with biological or physiological effectiveness, such as reinforced growth, growth, or storage of a lipid, after the check of a manifestation.

[0027] The fat tissue and the fat cell containing the introductory vehicle containing the nucleic-acid array adjusted in discernment in a fat cell can be obtained from the transfected biopsy of an organization. A fat cell is maintainable in primary culture using a standard approach. These fat cells are useful although the compound which analyzes the physiological effectiveness of a manifestation product and can change this physiological effectiveness is screened.

[0028] In another embodiment, the approach of changing growth of the fat cell in mammalian and metabolic accommodation is offered. For example, in

the patient of the obesity patient who needs to decrease the amount of adipose substances or the diabetes mellitus to which it is necessary to make the amount of adipose substances increase, cancer, or an acquired immunodeficiency syndrome, growth of a fat cell and metabolic accommodation are changeable. This approach includes prescribing for the patient the effective dose of the introductory vehicle which may invade into the fat cell of mammalian. Preferably, many target cells are transfected as much as possible in the effective dose of an introductory vehicle. For example, using the approach of illustrating to a postscript, even if there are few target cells, an introductory vehicle can be transfected to about 30% or more from about 9%. This introductory vehicle contains a nucleic-acid array, and a manifestation product is produced from this nucleic-acid array in a fat cell, and changes the growth in a fat cell, and metabolic accommodation. This nucleic-acid array may originate in the gene with which being adjusted in discernment in a fat cell is known. "Growth and a metabolic alteration" mean an increment or reduction of growth of a fat cell, storage, growth, and a metabolic turnover.

[0029] This invention relates to the identification approach of a nucleic-acid manifestation product of changing a metabolic turnover in a fat cell, and accommodation of growth, in another mode. This approach identifies a candidate nucleic-acid array, and includes introducing this nucleic-acid array all over the fat tissue of mammalian according to the above-mentioned introductory approach. A candidate nucleic-acid array can be identified and chosen from the origin of arbitration, and the introductory vehicle containing such a candidate nucleic-acid array can be built by the well-known approach by the technical field concerned. For example, this nucleic-acid array can be identified from databases, such as GenBank or an EMBL database. A manifestation product is made to produce from this nucleic-acid array. Growth of a fat cell and a metabolic change can be measured by the approach of a large number including the biological assay or visual monitoring of arbitration. Although inspection of change of the amount (for example, weight) of fat tissue and measurement of the increment in a heat production are included in the example of such measurement, it is not limited to these. Or the gestalt of the transfected fat cell can also be compared with contrast. For example, a brown fat cell has many big mitochondria and minute guttate reserve oil, and, on the other hand, a white fat cell stores a lipid as a single adhesive big lipid droplet.

[0030]

[Example] Below, an example explains this invention.

[0031] The in vivo transgenics recombination adenovirus vector to example 1 fat cell was used, and the nucleic-acid array was introduced by in vivo to rabbit fat tissue.

[0032] The adenovirus vector containing lacZcDNA combined with the construction CMV promotor of an adenovirus vector was manufactured by the approach of Spector and Samaniego, Meth.Mol.Genet., 1995, Vol.7, and p.31-44. Cloning of the lacZcDNA was carried out into the shuttle plasmid containing the left end of the adenovirus genome which has E1a deletion. This plasmid contains the enhancer parts of a replication origin, a duplication DNA packaging signal, and E1a imprint regulatory region again. Coincidence transfection of this shuttle plasmid and the deficit adenovirus DNA was carried out into the Homo sapiens embryo kidney 293 cell, and it rearranged by homologous recombination, and changed into adenovirus. The beta-galactosidase which is the gene product of lacZ presents blue under existence of 5-BUROMO-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactoside (X-gal).

[0033] The New Zealand (New Zealand) white rabbit of 3.4kg of checks of transgenics was anesthetized by ketamine. By 6cm \*\*\*\* incision, the fat pad ahead of a right rear quartet was exposed. The virion of the 1x10<sup>11</sup> plaque-forming unit (pfu) in the phosphate-buffered saline (PBS) of 500microl capacity was poured in into this fat pad. This fat pad was extracted at the sacrifice of the animal ten days after, and it cut to about 12 500mg splits.

[0034] Beta-galactosidase activity was detected by fixing for 30 minutes at 4 degrees C using a paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde (inside of PBS) 2%, and subsequently dyeing this organization for 90 minutes at 37 degrees C under existence of 1mg/ml X-gal. The electropositive single piece of fat tissue is shown in drawing 1 about beta-galactosidase activity. As for this, this transgenics is efficient, and it shows that a \*\* office is carried out very much.

[0035] MCSF protein was detected in the fat cell isolated from the fat tissue which is growing quickly around the intestines field from which inflammation is started in the manifestation skinfold thickness cell of MCSF in the inside of an example 2 Homo-sapiens skinfold thickness cell.

[0036] The fat cell was isolated from the biopsy of Homo sapiens fat tissue. The Northern blot of all RNA15microg fished with the antisense RNA probe to the base pairs 845-1460 of MCSFmRNA (GenBank, M64592) is shown in drawing 2 A. Messenger RNA was not detected at all. The protein from Homo sapiens fat tissue is incubated with a MCSF monoclonal antibody (MAB216, R&D systems), and the western blotting which detected MCSF protein is shown in drawing 2 B.

[0037] Reverse transcription PCR was performed on the messenger RNA extracted from the fat cell of Homo sapiens and a rabbit. After processing this mRNA for 15 minutes at 25 degrees C using DNase (Gibco), cDNA was obtained by the random hexamer reverse transcription by MORONI murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Sambrook and others, Molecular Cloning (1989), the 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory,

Plainview, NY). The specific primer (forward primer =GTC AAG GAC AGC ACC ATC GGT G (array number 1), Homo sapiens's MCSF nucleotides 805-826; reverse primer =GCT GTA CCA GTT ACA TCT GCC (array number 2), Homo sapiens's MCSF nucleotides 1077-1097) was used for Homo sapiens MCSF, and MCSFcDNA was amplified by denaturation (95 degrees C for 30 seconds), annealing (62 degrees C for 2 minutes), and PCR of 35 cycles of expanding (72 degrees C for 40 seconds). The product of about 300 base pairs was expected from this reaction. Although messenger RNA was detected in the Homo sapiens fat cell, it was not detected in the rabbit fat cell, as shown in drawing 2 C. The contrast reaction containing mRNA which does not carry out reverse transcription was negative. A product is acquired and by amplifying cDNA from a Homo sapiens fat cell library (Clontech) by the same MCSF primer shows this to the control house panel of drawing 2 C. [0038] The freezing Homo sapiens fat tissue intercept was dyed about MCSF using the Homo sapiens MCSF monoclonal antibody (MAB216, R&D Systems). Drawing 2 D shows dyeing in (i) under existence of an antibody. By (ii), dyeing was not detected at all under un-existing [ of an antibody ].

[0039] The mesentery fat was obtained from two patients of inflammatory bowel disease. Fat tissue was assembled from the part which adjoins the intestines which have caused inflammation in each case, and the field of the mesentery fat combined with the intestines which exist in 30cm or more remoteness from an inflammation part, and which look normal. Northern blot analysis (the aforementioned passage) of the fat cell isolated from these samples is shown in drawing 2 E. Although MCSFRNA was detectable only all over the organization which adjoined the intestines which have caused inflammation, this shows that up-regulation of the MCSF was carried out in the field around [ from which inflammation is started ] intestinal. Ponceaux S (Ponceau S) dyeing -- a MCSF antibody (MAB216, R&D Systems) -- a pan -- the immunity blot of a fat cell cell extract is shown in drawing 2 F the bottom. This drawing shows that up-regulation of the MCSF protein manifestation was carried out all over the fat tissue around an intestinal field which has caused inflammation.

[0040] MCSF to an example 3 hypodermically rabbit fat cell and the in vivo transgenics recombination adenovirus of the beta-galactosidase were used, and MCSF and the beta-galactosidase were introduced by in vivo all over rabbit fat tissue.

[0041] The adenovirus structure containing virus structure Homo sapiens MCSFcDNA (GenBank, M64592) was produced as given in an example 1.

[0042] In the transgenics experiment which carries out a design of experiment publication, the New Zealand (New Zealand) white rabbit of the 3.4-4.0kg (an average of 3.6kg) male of six animals was used. Each rabbit was anesthetized by ketamine, it fixed with a string and four guide pegs have been

arranged on their back. \*\*\*\* was shaved and the skin was defecated with antiseptics. Under the sterile condition, the 2cm Chuo Line middle (mid line mid-position) antinode incision which pierces through the skin, skinfold thickness, and a fascia layer was performed. The instrument which is not sharp was used, and the left-hand side of an antinode was dissected so that a fascia side might be divided. Subsequently, the skin, skinfold thickness, and a fascia were raised from the antinode muscular tissue. The 1/3ml insulin needle was used, and the depth of the skin, skinfold thickness, and a fascia layer was measured in some points which became a 1cm single tier from Chuo Line. It let the skin, skinfold thickness, and a fascia layer pass for four blue sutures, and from Chuo Line, by the way, it connected to the single tier, and two 8cm [ 3cm, 5cm 6cm and ] 2cm [ which was left 1cm bordering on \*\*\*\* ] fields were made from 3cm and \*\*\*\*\*.

[0043] A depth of 1.5–2mm was injected with the virion of the  $2.5 \times 10^{10}$  plaque-forming unit (pfu) of 25microl which contains the beta-galactosidase virus structure of a publication in the example 1 in one field. This injection was repeated 4 times. The field of another side was injected with four 25microl samples of the virion of  $2.5 \times 10^{10}$  pfu containing a MCSF virus structure. Incision was closed and the rabbit was returned to the cage.

[0044] The above-mentioned procedure was repeated on the right-hand side of this animal five days after. The relative position of the two sample was exchanged.

[0045] This animal was anesthetized five days after at the pan, the guide peg was bound, and it has arranged on its back. The pen was used and the rectangle of 2cm width of face was drawn on the perimeter of the suture train on the left-hand side of this animal. This rectangle was the thing the lowest [ of a suture ], and best elongated the bottom of 1cm, and on 1cm, respectively. The rectangle of the skin, skinfold thickness, and a fascia was excised with the scalpel, and it has arranged on the sheet plastic on dry ice immediately. The suture was crossed, the rectangle split of an organization was cut, two squares organizations of 2cm were obtained, one of these was transfected in a beta-galactosidase content virus, and another side was transfected in a MCSF content virus.

[0046] Weighing capacity of the two organization split was taken a photograph of and carried out. A photograph of each organization split originating in each started rectangle split was taken, and it divided into three partitions, fixed and intercept-ized in 10% formaldehyde, and saved in liquid nitrogen. The same procedure was repeated about the right-hand side of the antinode of this animal, and this animal was sacrificed for it. Total an organization of four squares was assembled from each animal.

[0047] The weight of the square organization (the 5th day and the 10th day) from the sample which transfected the weight MCSF of a square organization

is shown in Table 1 as compared with beta-galactosidase contrast. With the sample on the 5th which transfected MCSF, 150% of increment in square organization weight was accepted compared with beta-galactosidase contrast. With the sample on the 10th, the weight of the sample which transfected MCSF increased 200% to beta-galactosidase contrast. By extracting a lipid from this organization sample under chloroform, it checked that it was that by which the weight increase of the sample which transfected depends MCSF on the increment in a lipid content. The significant increment was accepted statistically [ a lipid content ] all over the fat tissue which introduced MCSF on the 5th ( $p < 0.01$ ) and the 10th ( $p < 0.0005$ ) as shown in drawing 3.

[0048]

[Table 1]

MCSF/ウイルスでの誘導の前および後の脂肪パッド重量 (g)

ウサギ	5 日目		10 日目	
	b-gal	MCSF	b-gal	MCSF
1	2.4	4.0	2.0	6.4
2	2.5	2.9	2.4	4.7
3	1.4	2.2	1.4	3.4
4	1.6	1.5	1.2	3.8
5	1.5	2.0	1.7	3.6
6	2.7	5.4	2.9	7.9
平均	2.02	3.00	1.93	4.38
SD	0.58	1.46	0.64	1.23
SE	0.24	0.60	0.26	0.50

[0049] Dyeing in the histological evaluation hematoxylin and eosine of a square organization estimated the square organization histologically. In some organization intercepts, although the number of acute and chronic-inflammation cells was increasing, dyeing was in agreement with the thing of normal fat tissue.

[0050] It judged whether counting of the cell from the frozen section slice of the size tissue of a fat cell would be carried out ( $n = 100$ ), and the averages of cell size would differ between the beta-galactosidase contrast with a sample which transfected MCSF. The difference of the average of cell size was not accepted at all.

[0051] The intercept of the thickness of 200 micrometers of detection of beta-galactosidase gene expression was digested for 30 minutes by collagenase (Sigma) 0.5%. Centrifugal [ for 5 minutes ] separated the fat cell by 2000g, and it fixed as given in an example 1, and, subsequently dyed by X-gal. The beta-galactosidase which is the gene product of lacZ presents blue under existence of X-gal. Optical microscope inspection investigated the cell about intracellular blue dyeing. Blue dyeing is expressed with the fat cell of a deeper color as shown in drawing 4. In the organization which



transfected the beta-galactosidase, blue dyeing existed in 9.3% of the cell from 12.5% of the cell from the 5th, and the 10th (Table 2). The positive stain was not accepted in the cell which isolated MCSF from the organization which transfected.

[0052]

[Table 2]

X-gal 染色の後の青色細胞の割合 (%)

5 日目			10 日目	
ウサギ	b-gal	MCSF	b-gal	MCSF
1	13	0	9	0
2	9	0	11	0
3	17	0	11	0
4	16	0	9	0
5	11	0	7	0
6	9	0	9	0
平均	12.5	0	9.3	0
SE	1.4		0.61	

[0053] The detection guanidine thio cyanate dissolution and homogenization of the MCSF gene expression in the fat tissue which introduced MCSF, and the chloroform extraction following it extracted all RNA from the organization intercept saved in liquid nitrogen. RNA was collected from this supernatant liquid by applying supernatant liquid to RNA Easy Column (Qiagen). After processing for 15 minutes at 25 degrees C using DNase (Gibco), cDNA was obtained by the random hexamer reverse transcription by MMLV reverse transcriptase (Sambrook and others, Molecular Cloning (1989), the 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY). The specific primer (forward primer = GTC AAG GAC AGC ACC ATC GGT G (array number 1) and reverse primer = GCT GTA CCA GTT ACA TCT GCC (array number 2)) was used for Homo sapiens MCSF, and MCSFcDNA was amplified by denaturation (95 degrees C for 30 seconds), annealing (62 degrees C for 2 minutes), and PCR of 35 cycles of expanding (72 degrees C for 40 seconds). The product of about 300 base pairs was expected from this reaction.

[0054] Gel electrophoresis separated the PCR product. The specific band of the die length expected was cut down from this gel, the filtration which lets a centrifugal chip pass recovered and sequencing was carried out. When the array acquired from this PCR reaction was compared with the well-known Homo sapiens MCSF array, it was shown that the amplified fragment is at least 95% homologous in each of those rabbits. In the sample which transfected the beta-galactosidase, although the band of the same size was amplified, it was equivalent to neither of the genes in a Genbank database. It was the same as that of Homo sapiens MCSF 46.6% in the 208nt field. It was checked that installation of Homo sapiens MCSF from these data to rabbit fat tissue had been successful.

[0055] The Homo sapiens MCSF protein manifestation was detected using the detection dot blot of a Homo sapiens MCSF protein manifestation. By freezing/fusion cycle and sonication to repeat, fat cell protein was isolated from the 80mg fat cell (underwater [ of 500microl ]). Suspension removed most lipids. This homogenate (2microl) was applied to the nitrocellulose membrane (Protran), and it blocked in 0.75%BSA for 2 hours. The blocked film was exposed to the 90-minute room and the anti-mouse antibody (R&D Systems) standard subsequently for 45 minutes at the monoclonal antibody (MAB216, R&D Systems) specific to Homo sapiens MCSF. Association of a second antibody was detected by ECL (Amersham) using the standard approach. The dot blot shown in drawing 5 shows that MCSF protein was detected only all over the organization which inoculated MCSF adenovirus.

[0056] The intracellular MCSF manifestation was detected using the detection immunocytochemistry of the fat cell MCSF protein in the fat tissue which introduced MCSF. The slide of an intercept-ized organization was dyed by the indicator streptoavidin-biotin immunity staining technique (Hsu, S.M. et al., 1981, J.Histochem.Cytochem., 29:577-580; Giorno, R.1984, DiagnosticImmunol., 2:161-166). MCSF protein was detected only all over the organization which inoculated MCSF adenovirus as shown in drawing 6 A and 6B.

[0057] detection of growth of a fat cell -- immunity dyeing in the growth nucleus marker (MIB-1) using a standard approach compared MCSF with the case of beta-galactosidase contrast of growth of the fat cell in the organization which transfected. What dyeing of the skinfold thickness (the 10th day) which introduced MCSF reinforced drawing 7 for is shown. Table 3 shows that the nuclear rate which shows the positive stain in the organization (both the 5th day and the 10th day) which transfected MCSF increased intentionally statistically.

[0058]

[Table 3]

MIB-1 染色脂肪細胞の割合 (%)

ウサギ	5 日目		10 日目	
	b-Gal	MCSF	b-Gal	MCSF
1	2	11	2	11
2	1	6	1	16
3	3	9	0	12
4	3	18	5	15
5	2	15	3	12
6	5	12	4	10
平均	2.67	11.83	2.50	12.67
SE	0.56	1.74	0.76	0.95

[0059] It was shown that the in vitro transgenics recombination adenovirus to an example 4 Homo-sapiens fat cell can introduce a nucleic-acid array into

the Homo sapiens fat cell who isolated from the fat tissue biopsy.

[0060] 5g of splits of Homo sapiens skinfold thickness was started from surgery SUPESHIMEN, and it gave as given in an example 3 at collagenase digestion. The fat cell was isolated by suspension as given in an example 3, and was divided into 2 sets. In one group, adenovirus 35microl of  $1 \times 10^{11}$  pfu containing the beta-galactosidase was added to the 3ml fat cell ( $1 \times 10^7$  cells / ml). PBS of 35microl was added in the group of the fat cell which is contrasted. 3ml DMEM (Gibco) was added to the group of both fat cells 1 hour after, and it incubated at 37 degrees C during the water bath currently rotated slowly overnight. 24 hours after, as given in an example 1, those fat cells were fixed and it dyed by X-gal. About 18% – 28% of the cell processed by adenovirus was a positivity about beta-galactosidase activity as drawing 8 R> 8 was shown by deep dyeing. The reference cell was negative about the beta-galactosidase.

[0061] It was shown that the ex vivo transgenics recombination adenovirus to an example 5 Homo-sapiens fat cell can introduce a nucleic-acid array by ex vivo all over Homo sapiens fat tissue.

[0062] Three 400mg Homo sapiens skinfold thickness SUPESHIMEN was started from surgery SUPESHIMEN. Two in these samples were injected with adenovirus 50microl of  $1 \times 10^{11}$  pfu containing the beta-galactosidase. The 3rd sample was injected with PBS of 50microl. These explants were left in 3ml DMEM (Gibco) in a 37-degree C incubator for 24 hours.

[0063] 24 hours after, as given in an example 3, the organization was given to collagenase digestion and the fat cell was isolated by suspension. After fixing for 10 minutes in 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde, this cell was dyed for 90 minutes by X-gal, and it observed under the microscope. An example of the fat cell dyed by X-gal is shown in drawing 9 . About 11 – 19% of the cell which transfected this virus was a positivity about beta-galactosidase dyeing. The organization and fat cell of contrast were negative about beta-galactosidase activity.

[0064] Although this invention has been explained with the detailed explanation beyond other embodiments, the above explanation illustrates the range of this invention defined by the claim, and should be understood not to be what limits it. Other modes, an advantage, and qualification are also included within the limits of a claim.

[0065]

[Layout Table]

SEQUENCE LISTING<110> Mayo Foundation for Medical Education and Research<120> GENE TRANSFER TO ADIPOCYTES <130> PA98-247 <150> US 08/890,467 <151> DNA[ 1997-07-09 <160> 2<210> 1<211> 22<212> ] <213> Artificial Sequence<220> <223> Designed oligonucleotide based on the sequence of nucleotides 805-826 of human MCSF (macrophage colony

stimulating factor) to act as a primer.<400> 1 gtcaaggaca gcaccatcgg tg 22  
<210> 2<211> 21 <212> DNA<213> Artificial Sequence<220> <223> Designed  
oligonucleotide based on the sequence of nucleotides 1077–1097 of human  
MCSF to act as a primer.<400> 2 gctgtaccag ttacatctgc c 21

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the rabbit fat pad which transfected the beta-galactosidase and was dyed by X-gal.

[Drawing 2] (A) is the Northern blot of Homo sapiens fat cell all RNA which carried out the probe by the antisense RNA to MCSF. (B) is the western blotting of Homo sapiens fat cell protein. (C) shows magnification of MCSF from the fat cell of a rabbit and Homo sapiens, and a human fat cell cDNA library. (D) shows immunity dyeing of Homo sapiens MCSF in the fat tissue in (ii) under (i) and un-existing under existence of a Homo sapiens MCSF monoclonal antibody. (E) is the Northern blot of all RNA that extracted from the mesentery fat cell which is in remoteness from intestines inflammation, or adjoins it, and carried out the probe by the antisense RNA to MCSF. (F) is the immunity blot of the mesentery fat cell which is in remoteness from intestines inflammation, or adjoins it which dyed by Ponceaux S and was exposed to the MCSF antibody.

[Drawing 3] It is the graph of the fat under 2x2cm square organization which started the beta-galactosidase and MCSF from the rabbit fat tissue which transfected which shows (%) comparatively.

[Drawing 4] X-gal dyeing of the fat cell from the rabbit fat tissue which transfected the beta-galactosidase is shown.

[Drawing 5] It is the dot blot of the rabbit fat tissue which transfected and dyed the beta-galactosidase and MCSF by the Homo sapiens MCSF antibody.

[Drawing 6] (A) And (B) shows immunity dyeing of the rabbit fat tissue which transfected MCSF and the beta-galactosidase, respectively.

[Drawing 7] Immunity dyeing by growth marker MIB-1 of the rabbit fat tissue which transfected the beta-galactosidase and MCSF is shown.

[Drawing 8] X-gal dyeing of the Homo sapiens fat cell which transfected the beta-galactosidase in in vitro is shown.

[Drawing 9] X-gal dyeing of the Homo sapiens fat tissue which transfected the beta-galactosidase in ex vivo is shown.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-127870

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月18日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>C 1 2 N 15/09  
5/10

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00  
5/00Z N A A  
B

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平10-194872

(22) 出願日 平成10年(1998) 7月9日

(31) 優先権主張番号 08/890467

(32) 優先日 1997年7月9日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 598091963

マヨ ファウンデーション フォー メデ  
イカル エデュケーション アンド リサ  
ーチアメリカ合衆国 55903 ミネソタ州, ロ  
チェスター, ファースト ストリート サ  
ウス ウェスト 200

(72) 発明者 ジェームズ エー. リバイン

アメリカ合衆国 55902 ミネソタ州, ロ  
チェスター, ストリート サウス ウェス  
ト 2008-6番

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪細胞への遺伝子導入

(57) 【要約】

【課題】 肥満細胞の成長および代謝の遺伝的調節の研究に有用な、また、目的とする遺伝子または核酸配列のタンパク質発現産物の生物学的効果の研究に有用なモデル系を提供する。

【解決手段】 哺乳動物の脂肪組織を、核酸配列を含有する導入ビヒクルと接触させることを含んでなる、脂肪細胞中に該核酸配列を導入するin vivo方法であって、該導入ビヒクルが該脂肪細胞に侵入する能力を有し、該脂肪細胞中に該核酸配列が導入されると、該核酸配列から発現産物が産生されることを特徴とする前記方法；該導入ビヒクルを含有する脂肪細胞；該脂肪細胞を含有する脂肪組織；哺乳動物の脂肪組織を該導入ビヒクルと接触させることにより該哺乳動物における脂肪細胞の成長および代謝を改変する方法；および脂肪細胞の成長および代謝に関与する核酸配列の同定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物の脂肪組織を、核酸配列を含有する導入ビヒクルと接触させることを含んでなる、脂肪細胞中に該核酸配列を導入するin vivo方法であって、該導入ビヒクルが該脂肪細胞に侵入する能力を有し、該脂肪細胞中に該核酸配列が導入されると、該核酸配列から発現産物が産生されることを特徴とする前記方法。

【請求項2】 さらに、該発現産物の存在を検出することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 さらに、該発現産物の存在を該脂肪細胞中の生理的効果と相関させることを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 該導入ビヒクルがアデノウイルスを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 該導入ビヒクルがリボソームを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 該核酸配列がマクロファージコロニー刺激因子またはその一部をコードする、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 該核酸配列が脂肪細胞中で識別的に調節される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 該核酸配列が、白色脂肪細胞対褐色脂肪細胞において識別的に調節される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 該核酸配列が脱共役タンパク質Iまたはその一部をコードする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 脂肪細胞中で識別的に調節される核酸配列を含有する導入ビヒクルを含んでなる、トランスフェクトされた脂肪細胞。

【請求項11】 脂肪組織であって、該脂肪組織中の少なくとも1つの脂肪細胞が、脂肪細胞中で識別的に調節される核酸配列を含有する導入ビヒクルを含むことを特徴とする前記脂肪組織。

【請求項12】 哺乳動物の脂肪組織を、核酸配列を含有する導入ビヒクルの有効量と接触させることを含んでなる、該哺乳動物における脂肪細胞の成長および代謝調節を改変する方法であって、該導入ビヒクルが該哺乳動物の脂肪細胞に侵入する能力を有し、該脂肪細胞中の該核酸配列からの発現産物が該脂肪細胞の成長および代謝調節を改変することを特徴とする前記方法。

【請求項13】 該核酸配列が脂肪細胞中で識別的に調節される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】 該核酸配列が、白色脂肪細胞対褐色脂肪細胞において識別的に調節される、請求項12に記載の方法。

【請求項15】 該核酸配列が脱共役タンパク質Iである、請求項14に記載の方法。

【請求項16】 脂肪細胞中での成長および代謝調節を改変する発現産物の同定方法であって、

a) 候補核酸配列を哺乳動物の脂肪組織中に導入して、

該脂肪細胞内で該候補核酸配列から該発現産物を産生させ、そして

b) 該脂肪細胞中での成長および代謝調節の変化を監視することを含んでなる前記方法。

【請求項17】 脂肪細胞の代謝の変化の監視が、脂肪組織の量の変化を調べることを含む、請求項16に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝物質を脂肪細胞中に導入する方法、遺伝子のスクリーニング、ならびに脂肪細胞の成長および代謝の調節に潜在的に関与しているそのような遺伝子の発現産物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】肥満は、過剰の脂肪組織が存在している状態と定義することができる。北米の人口の30~50%、および全世界の人口のかかなりの割合の人々が肥満になっている。肥満の影響、例えば非インスリン依存性糖尿病、冠動脈疾患および高血圧のため、1990年には就業不能(missed work)から458億ドルの直接費およびさらに230億ドルの間接費がかかったと推定されている(Gibbs, W.W., 1996年8月, Scientific American, p.88-94)。さらに、毎年推定300億ドルが減量製品につぎ込まれている(Gura, T., 1997, Science, 275: 751-753)。

【0003】時間の経過と共に集団内および個体内で肥満の発生に変化が生じることから、環境的要因が肥満の進展に何らかの役割を果たしていることが示唆されている。遺伝的要因も、肥満に大きな影響を及ぼすことが知られている。肥満の尺度の1つであるボディ・マス指数は、通常、家族の構成員の間では同様のものとなる。例えば、養子のボディ・マス指数は、養父母ではなく生みの親に似通ったものとなる。一卵性双生児での詳細な研究から、肥満に関する他の尺度(例えば、皮下皮脂(subcutaneous skinfold)厚、脂肪質量および脂肪なし質量)も同様のものとなることが示されている(Sorensen, T.I.A. 1995, Metabolism, 44: 4-6, Suppl. 3)。

【0004】過剰な脂肪組織は、エネルギー摂取とエネルギー消費との不均衡により蓄積する。肥満の治療では、通常、この不均衡を是正するために食事摂取を操作する。患者の教育を通じてカロリーの摂取を減少させる種々の肥満治療プログラムがあるが、5年または10年の追跡の後では約90%が失敗している。他のプログラムには、通常の食品を補充または置換するための栄養維持用調製物が含まれる。典型的には、患者がそのような補充剤を摂取するのをやめると、体重は再び増加してしまう(Pi-Sunyer, F.X., 1996, Clinical Therapeutics, 18(6): 1006-1035)。

【0005】肥満に対する現在の薬理学的療法のほとんどは、脳の視床下部を標的とすることにより、有意な体



重減少を得ようとするものである。しかしながら、療法を中断すると、患者の減少した体重が再び増加することが多い (Davis, R., 1996, *Drugs*, 52(5): 696-724; Ryan, D.H., 1996, *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, 25(4): 989-1004)。そのような療法には多くの経費がかかり、医師による監督と生涯にわたる処方とを要する。また、これらの療法は、重篤で不都合な副作用を引き起こすことがある。食欲抑制薬、特にフェンフルミン誘導体の使用は、この薬を3ヵ月以上摂取している患者では原発性肺高血圧症のリスクの増加に関連している (Abenhaim, Lら1996, *N. Engl. J. Med.*, 335: 609-616)。そのような療法には、心臓リズム異常、感覚中枢の変化などの他の副作用があると記載されている (Davis, R., 1996, *Drugs* 52(5): 696-724)。また、B3アドレナリン受容体アゴニストが、肥満に対する潜在的な治療薬として評価されているが、ヒトでの研究においては副作用プロフィールが好ましくなく長期効力が証明されなかったため、期待外れなものであった。

【0006】肥満のもう1つの可能な治療法は、手術である。胃バイパス手術は、正常な消化および吸収を維持する一方で胃のサイズを減少させることにより、患者の食事摂取を制限することを意図したものである。手術による高い死亡率(5%)および手術後の合併症のため、この治療は病的肥満の患者に制限されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】肥満の末端器官である脂肪細胞または脂肪組織中の遺伝的調節の解明については、これまでほとんど注目されていないが、そのような調節が、肥満の発生または予防において何らかの役割を果たしている可能性がある。肥満における治療的介入は中枢神経系に焦点が当てられてきたため、脂肪細胞または脂肪組織を標的とする治療法はほとんど開発されていない。脂肪細胞および脂肪組織は脂質の貯蔵および複雑な脂肪代謝の場であるため、脂肪細胞の成長および代謝の調節と肥満とに關与する遺伝子を同定し、脂肪細胞の調節におけるそのような遺伝子の役割の解明に有用なモデル系を開発することは有用であろう。そのようなモデル系は、肥満の治療および予防において脂肪組織を標的とした治療法の基礎を提供するかもしれない。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、脂肪細胞の成長および代謝の遺伝的調節の研究に有用な、また、目的とする遺伝子または核酸配列のタンパク質発現産物の生物学的効果の研究に有用なモデル系を提供する。本明細書中に開示するとおり、本発明は、核酸配列の発現産物を脂肪細胞中で産生させるように該脂肪細胞中に該核酸配列を導入する方法を提供する。また、該発現産物を、脂肪の貯蔵の増加または減少などの生理的效果と関連させることができる。本発明はまた、哺乳動物における脂

肪細胞の成長および/または代謝を改変する方法を提供し、この方法は、個々の患者の必要性に応じて肥満を治療したり脂肪貯蔵を促進するために、治療的に使用することができる。

【0009】本発明は、1つの態様において、脂肪細胞中に核酸配列を導入するin vivo方法を主題とする。この方法は、哺乳動物の脂肪組織を、該核酸配列を含有する導入ビヒクルと接触させることを含んでなる。該導入ビヒクル(例えば、アデノウイルスまたはリポソーム)は、脂肪細胞に侵入する能力を有し、核酸配列を含有する。該脂肪細胞中に該核酸配列が導入されると、該核酸配列から発現産物が産生される。この方法はさらに、該発現産物の存在を検出し、該発現産物の存在を該脂肪細胞中の生理的效果と相関させることを含むことが可能である。脂肪細胞中にin vivoで導入され生理的效果を与えると本明細書中に示す核酸配列の一例は、マクロファージコロニー刺激因子(MCSF)をコードする核酸配列である。

【0010】本発明において脂肪細胞中に導入する核酸配列は、脂肪細胞中で識別的(differentially)に調節されることが公知の配列(例えば、白色脂肪細胞対褐色脂肪細胞において識別的に調節されることが公知の配列)であってもよい。脱共役タンパク質I(UCPI)またはその一部は、白色脂肪細胞対褐色脂肪細胞において識別的に調節されることが公知の核酸配列の一例である。

【0011】本発明は、もう1つの態様において、脂肪細胞中で識別的に調節される核酸配列を含有する導入ビヒクルを含む脂肪細胞を主題とする。さらに、本発明は、哺乳動物から単離された脂肪組織であって、該脂肪組織が、脂肪細胞中で識別的に調節される核酸配列を含有する導入ビヒクルを保持する少なくとも1つの脂肪細胞を含有することを特徴とする脂肪組織を主題とする。

【0012】本発明は、さらにもう1つの態様において、哺乳動物における脂肪細胞の成長および代謝調節を改変する方法を主題とする。この方法は、哺乳動物の脂肪組織を、核酸配列を含有する導入ビヒクルの有効量と接触させる工程を含んでなり、該導入ビヒクルは、該哺乳動物の脂肪細胞に侵入する能力を有する。脂肪細胞中の該核酸配列からの発現産物の産生が、該脂肪細胞の成長および代謝調節を改変する。適当な核酸配列には、白色脂肪細胞対褐色脂肪細胞において識別的に調節される遺伝子またはその一部が含まれる。そのような核酸配列の一例としては、UCPIまたはその一部が挙げられる。この方法は、患者において肥満を治療したり脂肪組織の成長または増殖を促進するための治療的介入の基礎を提供する。

【0013】本発明は、もう1つの態様において、脂肪細胞中での成長および代謝調節を改変する核酸発現産物の同定方法に関する。候補核酸配列を、哺乳動物の脂肪組織中に導入する。この核酸配列から産物を発現させ、

脂肪細胞の成長および代謝調節の変化を監視する。脂肪組織の重量の変化を調べることは、脂肪細胞の成長および代謝調節を監視しうる好ましい方法の1つである。

【0014】本明細書中に記載するとおり、本発明は、いくつかの利点を有する。本発明が提供するモデル系は、脂肪細胞の代謝および成長の調節に関与しうる核酸配列を肥満の末端器官である脂肪細胞および脂肪組織中でin vivoでスクリーニングするのを可能にする。in vivoスクリーニングは、発現産物の効果が哺乳動物における他の生理的および生化学的過程からin vitro培養系のように独立していない生理的状況において、候補核酸配列の評価を可能にする。脂肪細胞の成長および代謝調節に関与する核酸配列を同定することにより、肥満に対する又は脂肪組織もしくは貯蔵脂質が欠損している患者に対する治療法の新規標的が提供される。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明は、脂肪細胞および脂肪組織中の核酸発現産物の生物学的効果をin vivoで調べる方法に関する。この方法では、遺伝物質を含有する導入ビヒクルと接触させることにより、哺乳動物の脂肪組織中の脂肪細胞中へ遺伝物質を導入する。脂肪細胞への侵入後、該遺伝物質から産物が発現される。

【0016】脂質を貯蔵する細胞である脂肪細胞は、未だ開発されていない肥満治療法の潜在的な標的である。肥満は過剰の脂肪組織が存在している状態であると定義されるため、この組織は該疾患の終末器官に相当する。脂肪細胞は、脂肪組織の90%以上を占める。他の主要成分である基質組織は、脂肪細胞を限局領域に構成させる繊維性帯、血管、神経およびリンパ管を含む。肥満のなり易さには遺伝的要因が関与しているが、このことは、遺伝子のアップレギュレーションまたは過剰発現などの脂肪細胞中の生物学的事象が、脂肪細胞中に脂肪として過剰のカロリーを貯蔵する感受性に媒介的に影響を及ぼしているか、あるいはそのような感受性を少なくともも反映していることを示唆している。

【0017】脂肪組織沈着の局所的な相違が、すべての哺乳動物において生じる。ヒトでは、局所的な脂肪組織沈着は、肥満に関連した代謝性罹患状態 (metabolic morbidity) の予兆となる。これらの観察と一致して、代謝活性および遺伝子発現が脂肪貯蔵部位または「貯留槽 (depots)」によって著しく異なると研究報告されている。脂肪組織が局所的に蓄積しうることを示唆するいくつかの一連の証拠がある。

【0018】第1に、ヒトでは体重が増加するにつれて、脂肪組織の既に存在する貯蔵槽のサイズが増加する。第2に、脂肪組織を局所部位から外科的に除去すると、脂肪組織の局所的な再蓄積がその部位に生じる。第3に、腸および皮膚の炎症は、炎症領域周辺の局所的な脂肪組織の成長に関連している。局所的な脂肪組織沈着を促進する原因因子は、未だ同定されていない。

【0019】脂肪細胞は、皮下、そして骨髄中にも見られる。骨髄脂肪細胞は、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、顆粒球コロニー刺激因子 (GCSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (MCSF) および種々のインターロイキンを含む多数のサイトカインを合成することが知られている。サイトカインは、多能性幹細胞の造血および終末分化に不可欠である (Yoshikubo, T. 1994, Blood, 84: 415-420)。組織学的には、骨髄および皮下の脂肪組織脂肪細胞は類似しており、脂質が細胞容量の95%を占める。

【0020】皮下脂肪組織は、貯蔵組織であると古くから考えられていたが、現在では、それがホルモンおよびサイトカインを分泌し、かつそのようなシグナルに应答することが知られている。体重の増加および脂肪組織質量の増加は皮下脂肪細胞中のTNF- $\alpha$ 発現の増加を伴い、一方、体重の減少はTNF- $\alpha$ の発現の減少を伴う (Hotamisligil, G.S. ら, 1993, Science, 259: 87-91)。皮下脂肪細胞はまた、げっ歯類動物の体重制御経路に関与するホルモンであるレプチンを分泌する (Saladin, R. ら, 1996, Hormone & Metabolic Research, 28(12): 638-641)。

【0021】白色脂肪細胞および褐色脂肪細胞の2つの異なる型の脂肪細胞が、それぞれ、白色脂肪組織および褐色脂肪組織を構成し、哺乳動物に存在している。白色脂肪細胞は、単一の大きな癒着性の脂質滴 (lipid droplet) として脂肪を貯蔵し、栄養要求に応じて後にそれを放出する。褐色脂肪細胞は、脂質を微小滴中に貯蔵し、ある種の哺乳動物およびヒトの新生児では熱の産生源となる。脱共役タンパク質 I (UCPI) は、褐色脂肪細胞のミトコンドリア膜に特有の33kDaのタンパク質であり、酸化的リン酸化から呼吸を脱共役させて熱を産生する。UCPIの発現は、寒冷および過剰のカロリー摂取に应答して交感神経系により調節される (Sears, I.B., 1996, Mol. Cell. Biol., 16(3): 3410-3419)。

【0022】本発明の1つの実施態様では、皮下哺乳動物脂肪組織内に位置する脂肪細胞中に核酸配列を導入するin vivo方法を提供する。この方法は、哺乳動物の脂肪組織を、脂肪細胞中に侵入しうる導入ビヒクルと接触させることを含んでなる。該導入ビヒクルは、核酸配列を含有し、それが脂肪細胞中に導入された後で、該核酸配列から発現産物が産生される。この方法は、脂肪細胞の成長および代謝の調節を改変する産物を発現する核酸配列の同定および評価に非常に有効なモデル系を提供する。

【0023】本発明で用いる「導入ビヒクル」は、接触により脂肪細胞に侵入し核酸配列を該細胞内に配置する能力を有する任意の物質を意味する。そのような物質の具体例には、組換えアデノウイルスおよびリポソームが含まれるが、これらに限定されるものではない。組換えアデノウイルスは、実験室内で容易に操作でき、遺伝子導入のための増殖が不要であり、宿主ゲノム中に組込ま

れることがめったにない (Smith, T.A.ら, 1993, Nat. Genet., 5: 397-402, Spector, D.J.およびSamaniago, L.A., 1995, Meth. Mol. Genet., 7: 31-44)。アデノウイルスは、種々の細胞型、例えば角質細胞、肝細胞、上皮細胞や、ごく最近では終末分化脂肪細胞へin vitroで導入するために使用されている (Gnudi, L., 1997, Mol. Endo., 11(1): 67-76, Frevert, E.U.およびKahn, B., 1997, Mol. Cell. Biol., 17(1): 190-198)。

【0024】リボソームは、in vitroおよびin vivoでの運搬担体として有用な人工膜小胞である。リボソームは、哺乳動物細胞の他に植物、酵母および細菌細胞中へ核酸配列を運搬するのに使用されている。リボソームの組成は、通常、リン脂質 (特に、高い相転移温度のリン脂質) の組合せであり、通常、ステロイド (特に、コレステロール) と組合せる。他のリン脂質または他の脂質を使用することも可能である。リボソームの物理的特性は、pH、イオン強度および二価陽イオンの存在に左右される。

【0025】本発明で用いる「核酸配列」は、ある完全なタンパク質またはその一部をコードするヌクレオチド配列を意味する。本発明の核酸配列は、RNAの形態、あるいはcDNA、合成DNAまたはゲノムDNAを含むDNAの形態であってもよい。DNAは、二本鎖または一本鎖であってもよい。この方法に適した核酸配列は、対象の任意の配列を含むことが可能であり、個体の脂肪細胞 (褐色脂肪中に存在する褐色脂肪細胞および白色脂肪中に存在する白色脂肪細胞などの種々の脂肪細胞型からのものを含む) 中で識別的に調節される (differentially regulated) ことが知られている遺伝子からの配列を含むことが可能である。本発明で用いる「識別的に調節される」は、細胞内での転写、プロセッシング、輸送、mRNA安定性または翻訳の制御に付されて、細胞によって異なる発現産物のプロファイルを与える核酸配列に向けられたものである。脂肪細胞中で識別的に調節されることが知られている核酸配列としては、例えば、リボタンパク質リパーゼ、レプチンおよびUCPIをコードする核酸配列などが挙げられる。

【0026】本発明において哺乳動物の脂肪組織をそのような導入ビヒクルと接触させる方法の具体例は、後記の実施例に記載する。一般には、哺乳動物の脂肪組織を、導入ビヒクルと注射により局所的に接触させる。接触の別法として、パッチまたはローションによる皮膚接触を利用することも可能であろう。脂肪組織を導入ビヒクルと接触させた後、該核酸配列から発現産物を産生させる。発現産物をコードするメッセンジャーRNAを検出するために、例えばノーザンブロットを用いることができる。また、例えば、ウェスタンブロット法および免疫ブロット法により発現産物の存在を検出することができる。導入ビヒクルの局所的な接触、およびそれに続く

核酸発現産物の発現により、非常に特異的な生物応答を模擬することが可能となる。さらに、局所投与は、不都合な副作用を最小限に抑えることができる。発現の確認後、発現産物の存在を、増強された増殖、成長または脂質の貯蔵などの生物学的または生理的效果と関連させることができる。

【0027】脂肪細胞中で識別的に調節される核酸配列を含有する導入ビヒクルを含む脂肪組織および脂肪細胞は、トランスフェクトされた組織の生検から得ることができる。脂肪細胞は、標準的な方法を用いて初代培養中で維持することができる。これらの脂肪細胞は、発現産物の生理的效果を分析し、該生理的效果を改変しうる化合物をスクリーニングするのに有用である。

【0028】もう1つの実施態様において、哺乳動物における脂肪細胞の成長および代謝の調節を改変する方法を提供する。例えば、脂肪質量を減少させる必要がある肥満患者、または脂肪質量を増加させる必要がある糖尿病、癌もしくはエイズの患者において、脂肪細胞の成長および代謝の調節を改変することができる。この方法は、哺乳動物の脂肪細胞に侵入しうる導入ビヒクルの有効量を投与することを含む。好ましくは、導入ビヒクルの有効量を、可能な限り多数の標的細胞にトランスフェクトする。例えば、後記に例示する方法を用いて、標的細胞の少なくとも約9%から約30%以上に導入ビヒクルをトランスフェクトすることができる。該導入ビヒクルは核酸配列を含有し、発現産物は脂肪細胞中の該核酸配列から産生され、脂肪細胞中の成長および代謝の調節を改変する。該核酸配列は、脂肪細胞中で識別的に調節されることが知られている遺伝子に由来するものであってもよい。「成長および代謝の改変」は、脂肪細胞の成長、貯蔵、増殖および代謝の増加または減少を意味する。

【0029】本発明は、もう1つの態様において、脂肪細胞中で代謝および成長の調節を改変する核酸発現産物の同定方法に関する。この方法は、候補核酸配列を同定し、上記導入方法に従い哺乳動物の脂肪組織中に該核酸配列を導入することを含む。候補核酸配列は、任意の起源から同定し選択することができる。そのような候補核酸配列を含有する導入ビヒクルは、当該技術分野で公知の方法により構築することができる。例えば、該核酸配列は、GenBankまたはEMBLデータベースなどのデータベースから同定することができる。該核酸配列から、発現産物を産生させる。脂肪細胞の成長および代謝の変化は、任意の生物学的アッセイまたは視覚的モニタリングを含む多数の方法で測定することができる。そのような測定的具体例には、例えば、脂肪組織の量 (例えば、重量) の変化の検査、および熟産生の増加の測定が含まれるが、これらに限定されるものではない。あるいは、トランスフェクトされた脂肪細胞の形態を対照と比較することもできる。例えば、褐色脂肪細胞は、多数の大きな

ミトコンドリアと微小滴状の貯蔵脂質とを有し、一方、白色脂肪細胞は、単一の大きな癒着性の脂質滴として脂質を貯蔵する。

#### 【0030】

【実施例】つぎに、実施例により本発明を説明する。

#### 【0031】実施例1

脂肪細胞へのin vivo遺伝子導入

組換えアデノウイルスベクターを使用して、ウサギ脂肪組織へ核酸配列をin vivoで導入した。

#### 【0032】アデノウイルスベクターの構築

CMVプロモーターに結合したlacZ cDNAを含有するアデノウイルスベクターを、SpectorおよびSamaniog, Met. h. Mol. Genet., 1995, Vol. 7, p.31-44の方法により製造した。Ela欠失を有するアデノウイルスゲノムの左末端を含有するシャトルプラスミド中に、lacZ cDNAをクローニングした。このプラスミドはまた、複製起点、重複DNAパッケージングシグナル、およびEla転写制御領域のエンハンサー部分を含有する。該シャトルプラスミドおよび欠損アデノウイルスDNAをヒト胎児腎293細胞中に同時トランスフェクトし、相同組換えにより組換えアデノウイルスに変換した。lacZの遺伝子産物であるβ-ガラクトシダーゼは、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトシド(X-gal)の存在下で青色を呈する。

#### 【0033】遺伝子導入の確認

3.4kgのニュージーランド(New Zealand)白色ウサギをケタミンで麻酔した。6cmの単径切開により、右後四分体の前方の脂肪パッドを露出させた。500μl容量のリン酸緩衝食塩水(PBS)中の $1 \times 10^{11}$ プラーク形成単位(pfu)のウイルス粒子を、該脂肪パッド中に注入した。10日後、その動物を犠牲にし、該脂肪パッドを摘出し、約12個の500mgの細片に切断した。

【0034】該組織を2%パラホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド(PBS中)を用い、4℃で30分間固定し、ついで1mg/ml X-galの存在下、37℃で90分間染色することにより、β-ガラクトシダーゼ活性を検出した。β-ガラクトシダーゼ活性に関して陽性の単一の脂肪組織片を図1に示す。これは、この遺伝子導入が効率的で非常に限局したものであることを示している。

#### 【0035】実施例2

ヒト皮下脂肪細胞中でのMCSFの発現

皮下脂肪細胞中、および炎症を起こしている腸領域の周囲で急速に成長している脂肪組織から単離した脂肪細胞中で、MCSFタンパク質を検出した。

【0036】ヒト脂肪組織の生検から、脂肪細胞を単離した。MCSF mRNA (GenBank, M64592)の塩基対845~1460に対するアンチセンスRNAプローブで釣り上げた全RNA 15μgのノーザンブロットを、図2Aに示す。メッセンジャーRNAは全く検出されなかった。ヒト脂肪組織からのタンパク質をMCSFモノクローナル抗体(MAB2

16, R&D systems)と共にインキュベートし、MCSFタンパク質を検出したウエスタンブロットを、図2Bに示す。

【0037】ヒトおよびウサギの脂肪細胞から抽出したメッセンジャーRNA上で逆転写PCRを行なった。該mRNAをDNアーゼ(Gibco)を用いて25℃で15分間処理した後、モロニー Maus 白血病ウイルス(MMLV)逆転写酵素によるランダムヘキサマー逆転写によりcDNAを得た(Sambrookら, (1989)Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)。ヒトMCSFに特異的なプライマー(フォワードプライマー=GTC AAG GAC AGC ACC ATC GGT G (配列番号1)、ヒトMCSFのヌクレオチド805~826; リバースプライマー=GCT GTA CCA GTT ACA TCT GCC (配列番号2)、ヒトMCSFのヌクレオチド1077~1097)を使用して、変性(95℃で30秒間)、アニーリング(62℃で2分間)および伸長(72℃で40秒間)の35サイクルのPCRで、MCSF cDNAを増幅した。この反応からは、約300塩基対の産物が予想された。図2Cに示すとおり、メッセンジャーRNAは、ヒト脂肪細胞中では検出されたが、ウサギ脂肪細胞中では検出されなかった。逆転写させないmRNAを含有する対照反応は、陰性であった。同じMCSFプライマーでヒト脂肪細胞ライブラリー(Clontech)からcDNAを増幅することによっても産物が得られ、これを図2Cの中央パネルに示す。

【0038】凍結ヒト脂肪組織切片を、ヒトMCSFモノクローナル抗体(MAB216, R&D Systems)を使用してMCSFに関して染色した。図2Dは、抗体の存在下(i)での染色を示す。抗体の不存在下(ii)では、染色は全く検出されなかった。

【0039】炎症性腸疾患の2人の患者から腸間膜脂肪を得た。それぞれの場合に、炎症を起こしている腸に隣接する部位と、炎症部位から30cm以上遠隔に存在する正常に見える腸に結合した腸間膜脂肪の領域とから、脂肪組織を集めた。これらのサンプルから単離した脂肪細胞のノーザンブロット分析(前記のとおり)を図2Eに示す。MCSF mRNAは、炎症を起こしている腸に隣接した組織中でのみ検出可能であったが、このことは、炎症を起こしている腸の周囲の領域でMCSFがアップレギュレーションされたことを示している。ポンソー-S(Ponceau S)で染色しMCSF抗体(MAB216, R&D Systems)にさらした脂肪細胞細胞抽出物の免疫ブロットを、図2Fに示す。この図は、炎症を起こしている腸の領域の周囲の脂肪組織中で、MCSFタンパク質発現がアップレギュレーションされたことを示している。

#### 【0040】実施例3

皮下ウサギ脂肪細胞へのMCSFおよびβ-ガラクトシダーゼのin vivo遺伝子導入

組換えアデノウイルスを使用して、MCSFおよびβ-ガラクトシダーゼをウサギ脂肪組織中にin vivoで導入した。

## 【0041】ウイルス構築物

ヒトMCSFcDNA (GenBank, M64592) を含有するアデノウイルス構築物を、実施例1に記載のとおりに作製した。

## 【0042】実験計画

記載する遺伝子導入実験では、3.4~4.0kg (平均3.6kg) の6匹の雄のニュージーランド (New Zealand) 白色ウサギを使用した。各ウサギをケタミンで麻酔し、4本の足をひもで固定して仰向けに配置した。腹毛を剃り、皮膚を防腐剤で清浄化した。無菌条件下で、皮膚、皮下脂肪および筋膜層を貫く2cmの中央線中位 (mid line mid-position) 腹切開を行なった。とがっていない道具を使用して、筋膜面を分割するように腹の左側を解剖した。ついで皮膚、皮下脂肪および筋膜を腹筋組織から持ち上げた。1/3mlのインスリン針を使用して、中央線から1cmの列になった数個の点において皮膚、皮下脂肪および筋膜層の深さを測定した。青い4本の縫合糸を、皮膚、皮下脂肪および筋膜層を通して、中央線から3cm、単径線から3cm、5cm、6cmおよび8cmのところで一列に結んで、単径を境界とし1cm離れた2cmの2個の領域を作った。

【0043】一方の領域では、実施例1に記載の $\beta$ -ガラクトシダーゼウイルス構築物を含有する25 $\mu$ lの $2.5 \times 10^{10}$ プラーク形成単位 (pfu) のウイルス粒子を、深さ1.5~2mmに注射した。この注射を4回繰返した。MCSFウイルス構築物を含有する $2.5 \times 10^{10}$  pfuのウイルス粒子の25 $\mu$ lサンプル4個を、他方の領域に注射した。切開を閉じ、そのウサギを檻へ戻した。

【0044】5日後、上記の手順を該動物の右側で繰返した。その2個のサンプルの相対位置を交換した。

【0045】さらに5日後、該動物を麻酔し、足を縛って仰向けに配置した。ペンを使用して、該動物の左側の縫合列の周囲に2cm幅の長方形を描いた。この長方形

は、縫合の最下および最上のそれぞれ1cm下および1cm上に伸張するものであった。皮膚、皮下脂肪および筋膜の長方形を小刀で切除し、直ちにドライアイス上のプラスチックシート上に配置した。組織の長方形細片を、縫合を横切って切断して、2個の2cmの正方形組織を得、その一方には $\beta$ -ガラクトシダーゼ含有ウイルスをトランスフェクトし、他方にはMCSF含有ウイルスをトランスフェクトした。

【0046】その2個の組織細片を写真撮影し、秤量した。切り出された各長方形細片に由来する各組織細片を写真撮影し、3個の区分に分割して、10%ホルムアルデヒド中で固定し、切片化し、液体窒素中に保存した。同じ手順を、該動物の腹の右側について繰返し、該動物を犠牲にした。各動物から合計4個の正方形組織を集めた。

## 【0047】正方形組織の重量

MCSFをトランスフェクトしたサンプルからの正方形組織 (5日目および10日目) の重量を、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ対照と比較し、表1に示す。MCSFをトランスフェクトした5日目のサンプルでは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ対照と比べて、正方形組織重量における150%の増加が認められた。10日目のサンプルでは、MCSFをトランスフェクトしたサンプルの重量は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ対照に対して200%増加した。クロロホルムで該組織サンプルから脂質を抽出することにより、MCSFをトランスフェクトしたサンプルの重量の増加が、脂質含量の増加によるものであることを確認した。図3に示すとおり、MCSFを導入した脂肪組織中で脂質含量の統計的に有意な増加が、5日目 ( $p < 0.01$ ) および10日目 ( $p < 0.0005$ ) に認められた。

## 【0048】

## 【表1】

MCSF/ウイルスでの誘導の前および後の脂肪パッド重量 (g)

ウサギ	5日目		10日目	
	b-gal	MCSF	b-gal	MCSF
1	2.4	4.0	2.0	6.4
2	2.5	2.9	2.4	4.7
3	1.4	2.2	1.4	3.4
4	1.6	1.5	1.2	3.8
5	1.5	2.0	1.7	3.6
6	2.7	5.4	2.9	7.9
平均	2.02	3.00	1.93	4.38
SD	0.58	1.46	0.64	1.23
SE	0.24	0.60	0.26	0.50

## 【0049】正方形組織の組織学的評価

ヘマトキシリンおよびエオシンでの染色により、正方形組織を組織学的に評価した。いくつかの組織切片中では急性および慢性炎症細胞の数が増加していたものの、染色は正常な脂肪組織のものと一致した。

## 【0050】脂肪細胞のサイズ

組織の凍結切片スライスからの細胞を計数して ( $n=10$ )、MCSFをトランスフェクトしたサンプルと $\beta$ -ガラクトシダーゼ対照との間で細胞サイズの平均が異なるか否かを判定した。細胞サイズの平均の相違は全く認められなかった。

【0051】 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子発現の検出



200 $\mu$ mの厚さの切片を0.5%コラゲナーゼ (Sigma) で30分間消化した。脂肪細胞を2000gで5分間の遠心で分離し、実施例1に記載のとおり固定し、ついでX-galで染色した。lacZの遺伝子産物である $\beta$ -ガラクトシダーゼは、X-galの存在下で青色を呈する。細胞内の青色染色に関して光学顕微鏡検査により細胞を調べた。図4に示すとおり、青色染色は、より濃い色の脂肪細胞で表さ

れる。 $\beta$ -ガラクトシダーゼをトランスフェクトした組織では、5日目からの細胞の12.5%、および10日目からの細胞の9.3%に青色染色が存在した(表2)。MCSFをトランスフェクトした組織から単離した細胞では、陽性染色は認められなかった。

【0052】

【表2】

X-gal 染色の後の青色細胞の割合 (%)

5 日目			10 日目	
ウサギ	b-gal	MCSF	b-gal	MCSF
1	13	0	9	0
2	9	0	11	0
3	17	0	11	0
4	16	0	9	0
5	11	0	7	0
6	9	0	9	0
平均	12.5	0	9.3	0
SE	1.4		0.61	

【0053】MCSFを導入した脂肪組織中のMCSF遺伝子発現の検出

グアニジンチオシアナート溶解およびホモジナイゼーション、およびそれに続くクロロホルム抽出により、液体窒素中に保存した組織切片から全RNAを抽出した。上清をRNA Easy Column (Qiagen) に適用することにより、該上清からRNAを回収した。DNアーゼ (Gibco) を用いて25℃で15分間処理した後、MLV逆転写酵素によるランダムヘキサマー逆転写によりcDNAを得た (Sambrookら, (1989) Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY)。ヒトMCSFに特異的なプライマー (フォワードプライマー=GTC AAG GAC AGC ACC ATC GGT G (配列番号1)、リバースプライマー=GCT GTA CCA GTT ACA TCT GCC (配列番号2)) を使用して、変性 (95℃で30秒間)、アニーリング (62℃で2分間) および伸長 (72℃で40秒間) の35サイクルのPCRで、MCSF cDNAを増幅した。この反応からは、約300塩基対の産物が予想された。

【0054】PCR産物をゲル電気泳動により分離した。予想される長さの特異的バンドを該ゲルから切り出し、遠心チップを通す過程により回収し、配列決定した。該PCR反応から得た配列を公知のヒトMCSF配列と比較したところ、増幅された断片は、それらの各ウサギにおいて少なくとも95%相同であることが示された。 $\beta$ -ガラクトシダーゼをトランスフェクトしたサンプルにおいては、同様のサイズのバンドの増幅を行なったが、Genbankデータベース中のいずれの遺伝子にも相当しなかった。それは、208ntの領域においてヒトMCSFと46.6%同一であった。これらのデータから、ウサギ脂肪組織へのヒトMCSFの導入が成功したことが確認された。

【0055】ヒトMCSFタンパク質発現の検出  
ドットプロットを用いて、ヒトMCSFタンパク質発現を検

出した。反復する凍結/融解サイクルおよび超音波処理により、80mgの脂肪細胞 (500 $\mu$ lの水中) から脂肪細胞タンパク質を単離した。脂質の大部分を浮遊により除去した。該ホモジネート (2 $\mu$ l) をニトロセルロース膜 (Protran) に適用し、0.75%BSA中で2時間ブロッキングした。そのブロッキングした膜を、ヒトMCSFに特異的なモノクローナル抗体 (MAB216, R&D Systems) に90分間、ついで標準的な抗マウス抗体 (R&D Systems) に45分間さらした。標準的な方法を用いて、二次抗体の結合をECL (Amersham) で検出した。図5に示すドットプロットは、MCSFタンパク質が、MCSFアデノウイルスを接種した組織中でのみ検出されたことを示している。

【0056】MCSFを導入した脂肪組織中の脂肪細胞MCSFタンパク質の検出

免疫細胞化学を用いて、細胞内MCSF発現を検出した。切片化組織のスライドを、標識ストレプトアビジン-ビオチン免疫染色法により染色した (Hsu, S.M.ら, 1981, J. Histochem. Cytochem., 29:577-580; Giorno, R. 1984, Diagnostic Immunol., 2:161-166)。図6Aおよび6Bに示すとおり、MCSFタンパク質は、MCSFアデノウイルスを接種した組織中でのみ検出された。

【0057】脂肪細胞の増殖の検出

標準的な方法を用いる増殖核マーカー (MIB-1) での免疫染色により、MCSFをトランスフェクトした組織における脂肪細胞の増殖を、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ対照の場合と比較した。図7は、MCSFを導入した皮下脂肪 (10日目) の染色が増強したことを示している。表3は、MCSFをトランスフェクトした組織 (5日目および10日目の両方) において陽性染色を示す核の割合が統計的に有意に増加したことを示している。

【0058】

【表3】

MIB-1 染色脂肪細胞の割合 (%)

5 日目			10 日目	
ウサギ	b-Gal	MCSF	b-Gal	MCSF
1	2	11	2	11
2	1	6	1	16
3	3	9	0	12
4	3	18	5	15
5	2	15	3	12
6	5	12	4	10
平均	2.67	11.83	2.50	12.67
SE	0.56	1.74	0.76	0.95

## 【0059】実施例4

ヒト脂肪細胞へのin vitro遺伝子導入

組換えアデノウイルスは、脂肪組織生検から単離したヒト脂肪細胞中に核酸配列を導入しうることが示された。

【0060】ヒト皮下脂肪の細片5gを外科スペシメンから切り出し、実施例3に記載のとおりコラゲナーゼ消化に付した。脂肪細胞を、実施例3に記載のとおり浮遊により単離し、2組に分けた。一方の組では、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する  $1 \times 10^{11}$  pfuのアデノウイルス35 $\mu$ lを、3mlの脂肪細胞 ( $1 \times 10^7$  細胞/ml) へ加えた。対照となる脂肪細胞の組では、35 $\mu$ lのPBSを加えた。1時間後、3mlのDMEM (Gibco) を脂肪細胞の両方の組へ加え、ゆっくり回転している水浴中、37℃で一晩インキュベートした。24時間後、実施例1に記載のとおり、それらの脂肪細胞を固定し、X-galで染色した。図8において濃い染色で示されるとおり、アデノウイルスで処理した細胞の約18%~28%が $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に関して陽性であった。対照細胞は $\beta$ -ガラクトシダーゼに関して陰性であった。

## 【0061】実施例5

ヒト脂肪細胞へのex vivo遺伝子導入

組換えアデノウイルスは、ヒト脂肪組織中へex vivoで核酸配列を導入しうることが示された。

【0062】400mgのヒト皮下脂肪スペシメン3個を、

外科スペシメンから切り出した。これらのサンプルのうちの2個に、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを含有する  $1 \times 10^{11}$  pfuのアデノウイルス50 $\mu$ lを注射した。3個目のサンプルには、50 $\mu$ lのPBSを注射した。これらの組織片を、37℃のインキュベーター内の3mlのDMEM (Gibco) 中に24時間放置した。

【0063】24時間後、実施例3に記載のとおり、その組織をコラゲナーゼ消化に付し、脂肪細胞を浮遊により単離した。2%パラホルムアルデヒド、0.2%グルタルアルデヒド中で10分間固定した後、該細胞をX-galで90分間染色し、顕微鏡下で観察した。X-galで染色された脂肪細胞の一例を図9に示す。該ウイルスをトランスフェクトした細胞の約11~19%が、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色に関して陽性であった。対照の組織および脂肪細胞は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に関して陰性であった。

## 【0064】他の実施態様

以上、本発明をその詳細な説明と共に説明してきたが、以上の説明は、特許請求の範囲で定められる本発明の範囲を例示するものであり、それを限定するものではないと理解されるべきである。他の態様、利点および修飾も、特許請求の範囲の範囲内に含まれる。

## 【0065】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Mayo Foundation for Medical Education and Research

<120> GENE TRANSFER TO ADIPOCYTES

<130> PA98-247

<150> US 08/890,467

<151> 1997-07-09

<160> 2

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide based on the sequence of nucleotides 805-826 of human MCSF (macrophage colony stimulating factor) to act as a primer.

<400> 1

gtcaaggaca gcaccatcgg tg

22

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide based on the sequence of nucleotides  
1077-1097 of human MCSF to act as a primer.

&lt;400&gt; 2

gctgtaccag ttacatctgc c

21

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 $\beta$ -ガラクトシダーゼをトランスフェクトしX-galで染色されたウサギ脂肪パッドである。

【図2】(A)は、MCSFに対するアンチセンスRNAでプローブしたヒト脂肪細胞全RNAのノーザンブロットである。(B)は、ヒト脂肪細胞タンパク質のウェスタンブロットである。(C)は、ウサギおよびヒトの脂肪細胞ならびにヒトの脂肪細胞cDNAライブラリーからのMCSFの増幅を示す。(D)は、ヒトMCSFモノクローナル抗体の存在下(i)および不存在下(ii)での脂肪組織中のヒトMCSFの免疫染色を示す。(E)は、腸炎症から遠隔にあるかそれに隣接する腸間膜脂肪細胞から抽出し、MCSFに対するアンチセンスRNAでプローブした全RNAのノーザンブロットである。(F)は、ボンソーSで染色しMCSF抗体にさらした、腸炎症から遠隔にあるかそれに隣接する腸間膜脂肪細胞の免疫ブロットである。

【図3】 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびMCSFをトランスフ

ェクトしたウサギ脂肪組織から切り出した2×2cmの正方形組織中の脂肪の割合(%)を示すグラフである。

【図4】 $\beta$ -ガラクトシダーゼをトランスフェクトしたウサギ脂肪組織からの脂肪細胞のX-gal染色を示す。

【図5】 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびMCSFをトランスフェクトしヒトMCSF抗体で染色したウサギ脂肪組織のドットブロットである。

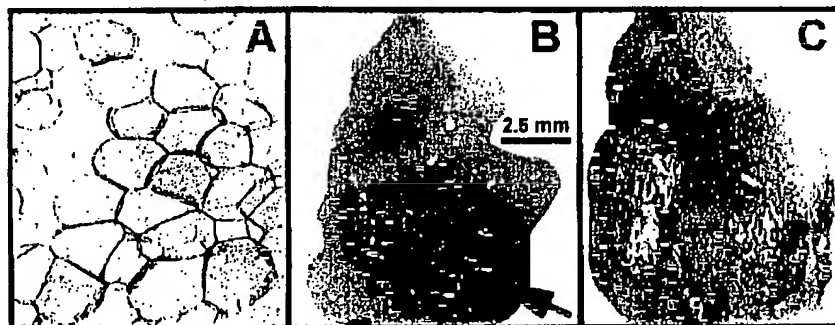
【図6】(A)および(B)は、それぞれMCSFおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼをトランスフェクトしたウサギ脂肪組織の免疫染色を示す。

【図7】 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびMCSFをトランスフェクトしたウサギ脂肪組織の、増殖マーカーMIB-1による免疫染色を示す。

【図8】 $\beta$ -ガラクトシダーゼをin vitroでトランスフェクトしたヒト脂肪細胞のX-gal染色を示す。

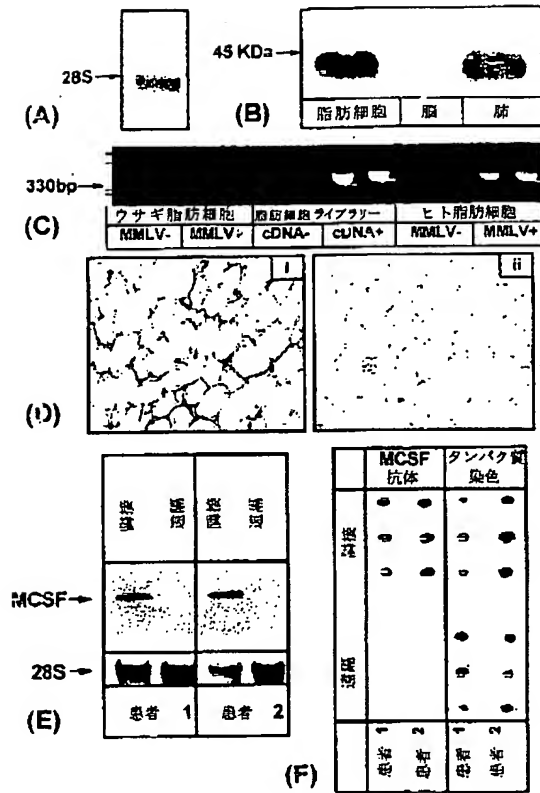
【図9】 $\beta$ -ガラクトシダーゼをex vivoでトランスフェクトしたヒト脂肪組織のX-gal染色を示す。

【図1】





【図2】

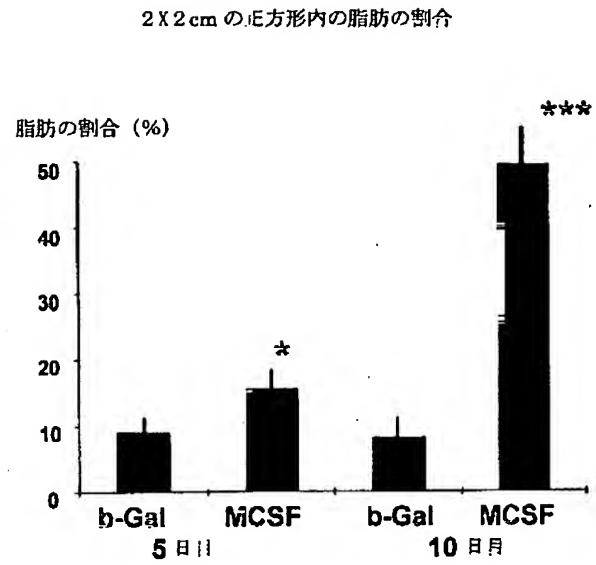


【図4】



「b-Gal」を接種したウサギ2の皮下脂肪のX-Gal 染色」

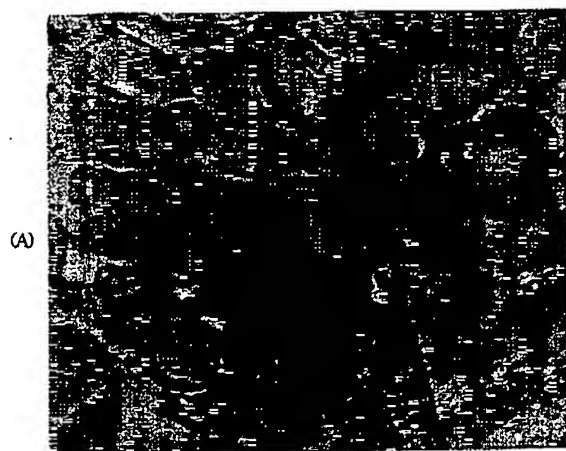
【図3】



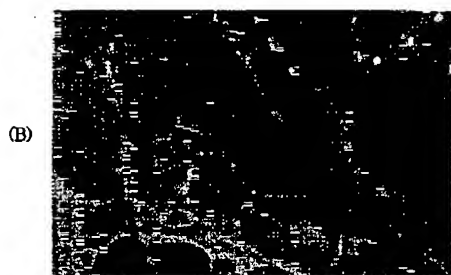
【図5】

陽性対照	1:100	1:1000
ウサギ 1	●	○
ウサギ 2	●	●
ウサギ 3	●	●
ウサギ 4	●	●
ウサギ 5	●	●
ウサギ 6	●	●
	Ad-βgal	Ad-MCSF
	5日目	10日目

【図6】

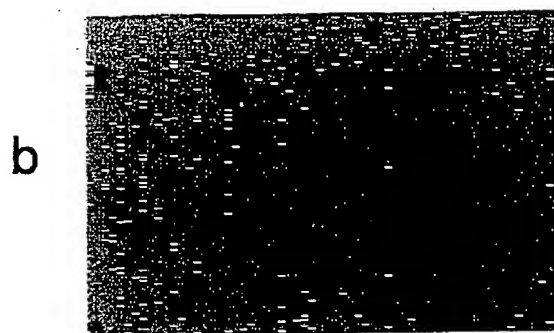
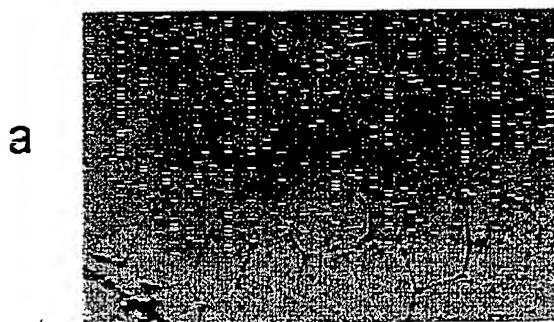


「MCSF を接種したウサギ2の5日目の皮下脂肪の免疫染色」



「b-Gal を接種したウサギ2の5日目の皮下脂肪の免疫染色」

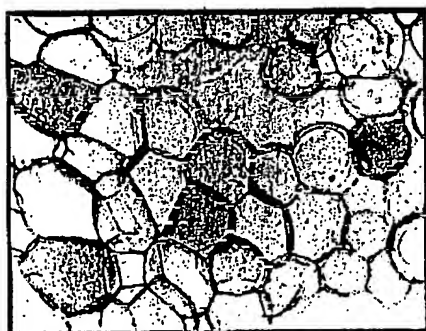
【図7】



「(a) b-Gal を導入した及び(b) MCSF を導入したウサギ4の10日目の皮下脂肪における増殖マーカー (MIB-1)」

【図8】

100 X



200 X

「Ad- $\beta$  Gal に in vitro でさらしたヒト脂肪細胞」

【図9】



「 $\beta$ -gal-アデノウイルスを ex vivo で接種したヒト脂肪組織からの  
Xgal 染色脂肪細胞」

---

フロントページの続き

(72)発明者 ノーマン エル. エバーハート  
アメリカ合衆国 55906 ミネソタ州, ロ  
チェスター, ストーン リッジ コート  
ノース イースト 3720

(72)発明者 マイケル ディー. ジェンセン  
アメリカ合衆国 55906 ミネソタ州, ロ  
チェスター, ヒドン ウェイ ノース イ  
ースト 3850

(72)発明者 ティモシー オブライエン  
アメリカ合衆国 55906 ミネソタ州, ロ  
チェスター, パークウッド ヒルズ ドラ  
イブ ノース イースト 2165

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**